



19049-005001/4905

SEQUENCE LISTING

<110> Nguyen, Jack

Thanos, Chris

Waugh Ruggles, Sandra

Craik, Charles S.

<120> METHODS OF GENERATING AND SCREENING FOR PROTEASES WITH ALTERED
SPECIFICITY

<130> 19049-005001/4905

<140> 10/677,977

<141> 2003-10-02

<150> 60/425,388

<151> 2002-10-02

<160> 57

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 277

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Glu Asn Thr Glu Asn Ser Val Asp Ser Lys Ser Ile Lys Asn Leu
1 5 10 15Glu Pro Lys Ile Ile His Gly Ser Glu Ser Met Asp Ser Gly Ile Ser
20 25 30Leu Asp Asn Ser Tyr Lys Met Asp Tyr Pro Glu Met Gly Leu Cys Ile
35 40 45Ile Ile Asn Asn Lys Asn Phe His Lys Ser Thr Gly Met Thr Ser Arg
50 55 60Ser Gly Thr Asp Val Asp Ala Ala Asn Leu Arg Glu Thr Phe Arg Asn
65 70 75 80Leu Lys Tyr Glu Val Arg Asn Lys Asn Asp Leu Thr Arg Glu Glu Ile
85 90 95Val Glu Leu Met Arg Asp Val Ser Lys Glu Asp His Ser Lys Arg Ser
100 105 110Ser Phe Val Cys Val Leu Leu Ser His Gly Glu Glu Gly Ile Ile Phe
115 120 125

Gly Thr Asn Gly Pro Val Asp Leu Lys Lys Ile Thr Asn Phe Phe Arg
 130 135 140

Gly Asp Arg Cys Arg Ser Leu Thr Gly Lys Pro Lys Leu Phe Ile Ile
 145 150 155 160

Gln Ala Cys Arg Gly Thr Glu Leu Asp Cys Gly Ile Glu Thr Asp Ser
 165 170 175

Gly Val Asp Asp Asp Met Ala Cys His Lys Ile Pro Val Asp Ala Asp
 180 185 190

Phe Leu Tyr Ala Tyr Ser Thr Ala Pro Gly Tyr Tyr Ser Trp Arg Asn
 195 200 205

Ser Lys Asp Gly Ser Trp Phe Ile Gln Ser Leu Cys Ala Met Leu Lys
 210 215 220

Gln Tyr Ala Asp Lys Leu Glu Phe Met His Ile Leu Thr Arg Val Asn
 225 230 235 240

Arg Lys Val Ala Thr Glu Phe Glu Ser Phe Ser Phe Asp Ala Thr Phe
 245 250 255

His Ala Lys Lys Gln Ile Pro Cys Ile Val Ser Met Leu Thr Lys Glu
 260 265 270

Leu Tyr Phe Tyr His
 275

<210> 2
<211> 6
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2

Phe Ser Phe Asp Ala Thr
 1 5

<210> 3
<211> 42
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Granzyme B Mutation Forward Primer

<400> 3
ccagcgtata attctaagac agcctccaat gacatcatgc tg

<210> 4
<211> 6
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 4

Ile Glu Thr Asp Ser Gly
1 5

<210> 5
<211> 42
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Granzyme B Mutation Reverse Primer

<400> 5
cagcatgatg tcattggagg ctgtcttaga attatacgct gg

42

<210> 6
<211> 6
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> Variant
<222> (1)..(1)
<223> Wherein Xaa is an N-acetyl group.

<220>
<221> Variant
<222> (6)..(6)
<223> Wherein Xaa is a 7-amino-4-methylcoumarin group.

<400> 6

Xaa Ile Glu Pro Asp Xaa
1 5

<210> 7
<211> 4
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 7

Ala Glu Ala Lys
1

<210> 8
<211> 4
<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Glu Asn Val Lys
1

<210> 9

<211> 4

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

Gly Thr Glu Asp
1

<210> 10

<211> 4

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

Ser Pro Thr Arg
1

<210> 11

<211> 4

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

Val Ser Thr Arg
1

<210> 12

<211> 4

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

Ser Thr Ser Phe
1

<210> 13

<211> 4

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 13

Lys Phe Pro Asp
1

<210> 14
<211> 4
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 14

Ala Glu Gln Arg
1

<210> 15
<211> 4
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 15

Lys Tyr Ala Asp
1

<210> 16
<211> 4
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 16

Asn Gly Pro Lys
1

<210> 17
<211> 4
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 17

Ser Ser Ala Tyr
1

<210> 18
<211> 4
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 18

Gly Thr Ser Asp
1

<210> 19
<211> 4
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 19

Ala Gln Glu Lys
1

<210> 20

<211> 4

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 20

Arg Ile Asp Tyr
1

<210> 21

<211> 4

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> IEPD

<400> 21

Ile Glu Pro Asp
1

<210> 22

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Ac-DEVD-AMC fluorogenic substrate

<220>

<221> MOD_RES

<222> 1

<223> N-acetyl

<220>

<221> MOD_RES

<222> 4

<223> AMC

<400> 22

Asp Glu Val Asp
1

<210> 23

<211> 4

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> granzyme B substrate specificity

<220>
<221> VARIANT
<222> 1
<223> Xaa= Ile or Leu

<220>
<221> VARIANT
<222> 3
<223> Xaa = any amino acid

<400> 23
Xaa Glu Xaa Asp
1

<210> 24
<211> 4
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Granzyme A substrate specificity

<220>
<221> VARIANT
<222> 1
<223> Xaa= Ile or Val

<220>
<221> VARIANT
<222> 2
<223> Xaa= Ala or Gly

<220>
<221> VARIANT
<222> 3
<223> Xaa= Asn, Asp or Glu

<400> 24
Xaa Xaa Xaa Arg
1

<210> 25
<211> 4
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Cathepsin G substrate specificity

<220>
<221> VARIANT
<222> 1
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> VARIANT
<222> 2
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> VARIANT
<222> 3
<223> Xaa= Val or Leu

<220>
<221> VARIANT
<222> 4
<223> Xaa= Phe or Lys

<400> 25
Xaa Xaa Xaa Xaa
1

<210> 26
<211> 4
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> MTSP-1 substrate specificity

<220>
<221> VARIANT
<222> 1
<223> Xaa= Arg or any hydrophobic amino acid

<220>
<221> VARIANT
<222> 2
<223> Xaa= Arg or any hydrophobic amino acid

<220>
<221> VARIANT
<222> 3
<223> Xaa= Ser or Thr

<220>
<221> VARIANT
<222> 4
<223> Xaa= Arg or Lys

<400> 26
Xaa Xaa Xaa Xaa
1

<210> 27
<211> 4
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Neutrophil Elastase substrate specificity

<220>
<221> VARIANT
<222> 1
<223> Xaa= Arg, Met or Lys

<220>
<221> VARIANT
<222> 2
<223> Xaa= Gln or Glu

<220>
<221> VARIANT
<222> 3
<223> Xaa= Pro or Ala

<220>
<221> VARIANT
<222> 4
<223> Xaa= Val, Ala or Ile

<400> 27
Xaa Xaa Xaa Xaa
1

<210> 28
<211> 4
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Chymase substrate specificity

<220>
<221> VARIANT
<222> 1
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> VARIANT
<222> 2
<223> Xaa= Glu or Ala

<220>
<221> VARIANT
<222> 3
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> VARIANT
<222> 4
<223> Xaa= Phe or Tyr

<400> 28
Xaa Xaa Xaa Xaa
1

<210> 29
<211> 4
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Chymotrypsin substrate specificity

<220>
<221> VARIANT
<222> 1
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> VARIANT
<222> 2
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> VARIANT
<222> 3
<223> Xaa= Val or Pro

<220>
<221> VARIANT
<222> 4
<223> Xaa= Phe or Tyr

<400> 29
Xaa Xaa Xaa Xaa
1

<210> 30
<211> 4
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Easter substrate specificity

<220>
<221> VARIANT
<222> 1
<223> Xaa = Ile or Val

<220>
<221> VARIANT
<222> 2
<223> Xaa = Glu or Ala

<220>
<221> VARIANT
<222> 3
<223> Xaa = Val or Leu

<400> 30
Xaa Xaa Xaa Arg
1

<210> 31
<211> 4
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Factor Xa substrate specificity

<220>
<221> VARIANT
<222> 1
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> VARIANT
<222> 2
<223> Xaa= any amino acid

<400> 31
Xaa Xaa Gly Arg
1

<210> 32
<211> 4
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Plasma Kallikrein substrate specificity

<220>
<221> VARIANT
<222> 1
<223> Xaa= any hydrophobic amino acid

<220>
<221> VARIANT
<222> 2
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> VARIANT
<222> 3
<223> Xaa= Phe or Tyr

<400> 32
Xaa Xaa Xaa Arg
1

<210> 33
<211> 4
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Plasmin substarte specificity

<220>
<221> VARIANT
<222> 2
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> VARIANT
<222> 3
<223> Xaa= Trp or Phe

<400> 33
Lys Xaa Xaa Lys
1

<210> 34
<211> 4
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Thrombin substrate specificity

<220>
<221> VARIANT
<222> 1
<223> Xaa= Phe or Leu

<220>
<221> VARIANT
<222> 2
<223> Xaa= any amino acid

<400> 34
Xaa Xaa Pro Arg
1

<210> 35
<211> 4
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> tPA substrate specificity

<220>
<221> VARIANT
<222> 1
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> VARIANT
<222> 2
<223> Xaa= Thr or Ser

<220>
<221> VARIANT
<222> 3
<223> Xaa=Gly or Ser

<400> 35
Xaa Xaa Xaa Arg
1

<210> 36
<211> 4
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> uPA substrate specificity

<220>
<221> VARIANT
<222> 1
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> VARIANT
<222> 2
<223> Xaa= Thr or Ser

<220>
<221> VARIANT
<222> 3
<223> Xaa= Ser or Ala

<400> 36
Xaa Xaa Xaa Arg
1

<210> 37
<211> 4
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> I99F granzyme B substrate spec.

<220>
<221> VARIANT
<222> 1
<223> Xaa= Ile or Val

<220>
<221> VARIANT
<222> 3
<223> Xaa = any amino acid

<400> 37
Xaa Glu Xaa Asp
1

<210> 38
<211> 4
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> I99A granzyme B substrate spec.

<220>
<221> VARIANT
<222> 1
<223> Xaa= Ile or Val

<400> 38
Xaa Glu Phe Asp
1

<210> 39
<211> 4
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> I99K granzyme B substrate spec.

<220>
<221> VARIANT
<222> 1
<223> Xaa= Ile or Val

<220>
<221> VARIANT
<222> 3
<223> Xaa= any amino acid

<400> 39
Xaa Glu Xaa Asp
1

<210> 40
<211> 4
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> N218A granzyme B substrate spec.

<220>
<221> VARIANT
<222> 1
<223> Xaa= Ile or Val

<220>
<221> VARIANT
<222> 2
<223> Xaa= any amino acid

<220>
<221> VARIANT
<222> 3
<223> Xaa= any amino acid

<400> 40
Xaa Xaa Xaa Asp
1

<210> 41
<211> 4
<212> PRT

<213> Homo sapiens
<220>
<223> N218T granzyme B substrate spec.

<220>
<221> VARIANT
<222> 1
<223> Xaa= Ile or val

<220>
<221> VARIANT
<222> 2
<223> Xaa= Ala or Ser

<220>
<221> VARIANT
<222> 3
<223> Xaa= any amino acid

<400> 41
Xaa Xaa Xaa Asp
1

<210> 42
<211> 4
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> N218V granzyme B substrate spec.

<220>
<221> VARIANT
<222> 1
<223> Xaa=Ile or Val

<220>
<221> VARIANT
<222> 2
<223> Xaa=any amino acid

<220>
<221> VARIANT
<222> 3
<223> Xaa=any amino acid

<400> 42
Xaa Xaa Xaa Asp
1

<210> 43
<211> 4
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>

<223> R192A granzyme B substrate spec.

<220>

<221> VARIANT

<222> 1

<223> Xaa= Ile or Val

<220>

<221> VARIANT

<222> 3

<223> Xaa= any amino acid

<400> 43

Xaa Glu Xaa Asp

1

<210> 44

<211> 4

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> R192E granzyme B substrate spec.

<220>

<221> VARIANT

<222> 1

<223> Xaa= Ile or Val

<220>

<221> VARIANT

<222> 2

<223> Xaa= Lys, Gln or Ser

<220>

<221> VARIANT

<222> 3

<223> Xaa=any amino acid

<400> 44

Xaa Xaa Xaa Asp

1

<210> 45

<211> 4

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Y174A granzyme B substrate spec.

<220>

<221> VARIANT

<222> 1

<223> Xaa= Ile Val or Leu

<220>
<221> VARIANT
<222> 3
<223> Xaa= any amino acid

<400> 45
Xaa Glu Xaa Asp
1

<210> 46
<211> 4
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Y174V granzyme B substrate spec.

<220>
<221> VARIANT
<222> 1
<223> Xaa=Ile or Val

<220>
<221> VARIANT
<222> 3
<223> Xaa=any amino acid

<400> 46
Xaa Glu Xaa Asp
1

<210> 47
<211> 4
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> I99A/N218A granzyme B substrate spec.

<220>
<221> VARIANT
<222> 1
<223> Xaa=Phe, Leu, Ile or Val

<220>
<221> VARIANT
<222> 2
<223> Xaa= Ala or ser

<400> 47
Xaa Xaa Phe Asp
1

<210> 48
<211> 4
<212> PRT

<213> Homo sapiens
<220>
<223> R192A/N218A granzyme B substrate spec.

<220>
<221> VARIANT
<222> 1
<223> Xaa= Ile or Val

<220>
<221> VARIANT
<222> 2
<223> Xaa= Ala, Gln or Ser

<220>
<221> VARIANT
<222> 3
<223> Xaa= any amino acid

<400> 48
Xaa Xaa Xaa Asp
1

<210> 49
<211> 4
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<220>
<223> R192E/N218A granzyme B substrate spec.

<220>
<221> VARIANT
<222> 1
<223> Xaa= Ile or Val

<220>
<221> VARIANT
<222> 2
<223> Xaa= Arg, Lys or Ala

<220>
<221> VARIANT
<222> 3
<223> Xaa= any amino acid

<400> 49
Xaa Xaa Xaa Asp
1

<210> 50
<211> 4
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>

<223> Cathepsin G substrate specificity

<220>

<221> VARIANT

<222> 1

<223> Xaa=any amino acid

<220>

<221> VARIANT

<222> 2

<223> Xaa=any amino acid

<220>

<221> VARIANT

<222> 3

<223> Xaa=Phe or Trp

<220>

<221> VARIANT

<222> 4

<223> Xaa=Arg or Lys

<400> 50

Xaa Xaa Xaa Xaa

1

<210> 51

<211> 4

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Cathepsin V substrate spec.

<220>

<221> VARIANT

<222> 1

<223> Xaa= any amino acid

<220>

<221> VARIANT

<222> 2

<223> Xaa= Pro or any amino acid

<220>

<221> VARIANT

<222> 3

<223> Xaa= Trp, Tyr or Phe

<220>

<221> VARIANT

<222> 4

<223> Xaa= any amino acid

<400> 51

Xaa Xaa Xaa Xaa

1

<210> 52
<211> 4
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Cathepsin K substrate spec.

<220>
<221> VARIANT
<222> 1
<223> Xaa=any amino acid

<220>
<221> VARIANT
<222> 2
<223> Xaa=any amino acid

<220>
<221> VARIANT
<222> 3
<223> Xaa=Leu or Pro

<220>
<221> VARIANT
<222> 4
<223> Xaa=Arg or Lys

<400> 52
Xaa Xaa Xaa Xaa
1

<210> 53
<211> 4
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Cathepsin S substrate spec.

<220>
<221> VARIANT
<222> 1
<223> Xaa=any amino acid

<220>
<221> VARIANT
<222> 2
<223> Xaa=Arg or any amino acid

<220>
<221> VARIANT
<222> 3
<223> Xaa=Val, Leu or Met

<220>
<221> VARIANT
<222> 4

<223> Xaa=Lys or Arg

<400> 53

Xaa Xaa Xaa Xaa

1

<210> 54

<211> 4

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Cathepsin F substrate spec.

<220>

<221> VARIANT

<222> 1

<223> Xaa=any amino acid

<220>

<221> VARIANT

<222> 3

<223> Xaa=any amino acid

<220>

<221> VARIANT

<222> 4

<223> Xaa=Lys or Arg

<400> 54

Xaa Xaa Leu Xaa

1

<210> 55

<211> 4

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Cathepsin B substrate spec.

<220>

<221> VARIANT

<222> 1

<223> Xaa=any amino acid

<220>

<221> VARIANT

<222> 2

<223> Xaa=Pro or any amino acid

<220>

<221> VARIANT

<222> 3

<223> Xaa=Val, Phe or Tyr

<220>

<221> VARIANT
<222> 4
<223> Xaa=Arg or Lys

<400> 55
Xaa Xaa Xaa Xaa
1

<210> 56
<211> 4
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Papain substrate spec.

<220>
<221> VARIANT
<222> 1
<223> Xaa=any amino acid

<220>
<221> VARIANT
<222> 2
<223> Xaa=Pro or any amino acid

<220>
<221> VARIANT
<222> 3
<223> Xaa=Val, Phe or Tyr

<220>
<221> VARIANT
<222> 4
<223> Xaa=Arg or Lys

<400> 56
Xaa Xaa Xaa Xaa
1

<210> 57
<211> 4
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<223> Cruzain substrate spec.

<220>
<221> VARIANT
<222> 1
<223> Xaa=any amino acid

<220>
<221> VARIANT
<222> 2
<223> Xaa=Arg or any amino acid

<220>
<221> VARIANT
<222> 3
<223> Xaa=Leu, Phe or Tyr

<220>
<221> VARIANT
<222> 4
<223> Xaa=Arg or Lys

<400> 57
Xaa Xaa Xaa Xaa
1